

マダイ好中球の形態学のおよび細胞化学的特徴

近藤昌和*, 坂口隆亮, 金丸俊介, 柏村直宏, 高橋幸則

Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophil from Red Sea-bream, *Pagrus major*

Masakazu Kondo*, Takasuke Sakaguchi, Shunsuke Kanamaru, Naohiro Kashiwamura and Yukinori Takahashi

Abstract : Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil in red sea-bream, *Pagrus major* were examined by light microscopy. The neutrophils were round to oval (7.5–11.5 μm in diameter) and the nucleus round to kidney-shaped. Granules of the neutrophil were classified into two types ; acidophilic granule (αG) and chromophobic granule (βG). The αG was round to oval (0.4 μm in diameter) and stained with May-Grünwald (MG) and MG-Giemsa (MGG) stain. The Giemsa staining pattern of the granule was influenced by pH and concentration of diluent of the staining solution. Some enzymes, such as acid phosphatase, α -naphthyl acetate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase were detected in the αG . The βG was round to oval ($\leq 0.5\ \mu\text{m}$ in diameter) and unstained by Romanowsky type stain (MG, Giemsa and MGG). This granule was peroxidase and sudan black B positive. The Yasumoto body (Y-body) was also found in the neutrophil and toluidine blue positive.

Key words : neutrophil, granulocyte, red sea-bream, *Pagrus major*, morphology

1 緒 言

著者らはこれまでに、多条件下におけるRomanowsky型染色評価法 (Multiple Romanowsky-type stain valuation, MRSV)¹⁾ によって、各種真骨魚類の好中球顆粒の種類数について明らかにしてきた¹⁻¹⁰⁾。その結果、真骨魚類は好中球顆粒の種類数の違いから、3群に大別され、真骨魚類の中で祖先種が最も早期に出現したアジアアロワナ *Scleropages formosus* (アロワナ下区アロワナ目¹³⁾) では、 α 顆粒、難染色性顆粒 (β 顆粒) および γ 顆粒の3種類の顆粒が認められた²⁾。また、好中球に3種類の顆粒が認められるI群には、アジアアロワナの他に、ウナギ *Anguilla japonica* (カライワシ下区ウナギ目¹³⁾)¹⁾、および真骨魚類からアロワナ下区とカライワシ下区を除いたクルパオセファラ類¹³⁾のうち、最初に分岐したニシン・骨鰈下区¹³⁾に属するコイ *Cyprinus carpio* (骨鰈上目コイ目) が含まれることから^{3, 4)}、I群の形質は、真骨魚類好

中球の原型であると推察されている²⁾。II群の好中球には α 顆粒と β 顆粒が認められ、これまでに、トラフグ *Takifugu rubripes* (正真骨下区棘鱗上目フグ目) に観察されている⁵⁾。フグ目はスズキ目から派生したと考えられているが¹⁴⁾、トラフグと同様の好中球は、他魚種には認められておらず、本群の好中球形態に基づく系統進化上の位置付けが明確ではない。III群の好中球には β 顆粒のみが認められ、ノーザンパイク *Exos lucius* (正真骨下区原棘鱗上目カワカマス目¹³⁾) や⁶⁾、各種スズキ目魚類 (メジナ *Girella punctata*, オオクチバス *Micropterus salmoides*, ブルーギル *Lepomis macrochirus*, スズキ *Lateolabrax japonicus*, ヒラスズキ *L. latus*, タイリクスズキ *L. sp.*)^{7, 9, 10)} およびスズキ目から派生したとされる正真骨下区棘鱗上目カレイ目¹⁴⁾のヒラメ *Paralichthys olivaceus* が含まれることから⁸⁾、現生真骨魚類のうち、新顎類¹³⁾に広範囲に渡って受け継がれている形質と考えられている²⁾。しかし、スズキ目の

2009年1月27日受付. Received January 27, 2009.

水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University).

*別刷り請求先 (Corresponding author).

ナイルティラピア *Oreochromis niloticus* およびイサキ *Parapristipoma trilineatum* は I 群に属する^{11, 12)}。したがって、スズキ目魚類は、好中球内の顆粒の種類数からみて、多系統ではないかと考えられる。

本研究では、スズキ目魚類における好中球顆粒の多様性を明らかにする研究の一環として、マダイ *Pagrus major* 好中球の形態学および細胞化学的特性を明らかにし、これまでに報告した各種魚類と比較した。

2 材料および方法

体重約200gのマダイを実験に供した。実験期間中の水温は $23.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ であり、市販の配合飼料を適宜給餌した。血液塗沫標本の作製、多条件下Romanowsky型染色評価法および各種細胞化学的染色法は前報¹⁾にしたがった。

3 結果

マダイ好中球の各種Romanowsky型染色像をFigs. 1～4に示した。好中球は長径 $7.5 \sim 11.5 \mu\text{m}$ の円形または卵円形であり、細胞質内には α 顆粒と β 顆粒とともに、安本小体(Y小体)が観察された。しかし、 γ 顆粒は認められなかった。種々の形態の核が偏在していたが、分葉核は観察されなかった。

α 顆粒は、長径 $0.4 \mu\text{m}$ 以下の円形または卵円形であり、細胞質に多数散在していた。本顆粒は、メイ-グリュンワルド(MG)原液による固定では淡赤色を呈し多数観察された(Fig. 1)。また、各種希釈液を用いたMG染色によって多数観察され(Fig. 2)、その色調は、pH8.0の低濃度(5mM)リン酸緩衝液の場合には淡赤色であったが(Fig. 2-5)、他の希釈液を用いた場合には、いずれも赤色であった。メタノール固定(5分間)した標本にギムザ染色を施したところ、希釈液に蒸留水を用いた場合には、希釈率1:100ではいずれの染色時間においても、多数の淡赤色顆粒が観察された(Figs. 3-2, 3-3)。しかし、希釈率1:20では、いずれの染色時間においても、観察される α 顆粒は少数であり、淡赤色を呈した(Figs. 3-1, 3-2)。また、低濃度の緩衝液を用いた場合も、蒸留水と同様であったが(Figs. 3-5～3-20)、pH5.0では希釈率1:20において、60分間の染色では α 顆粒が観察されなかった(Fig. 3-6)。一方、高濃度($1/15\text{M}$)のリン酸緩衝液を用いたギムザ染色では、pH7.0および8.0の場合、

希釈率1:100では、いずれの染色時間においても本顆粒は淡赤色を呈し、多数観察された(Figs. 3-31, 3-32, 3-35, 3-36)。しかし、他の条件では観察される α 顆粒は少数であった(Figs. 3-21～3-30, 3-33, 3-34)。MG染色後にギムザ染色を施すMGG染色では、いずれの条件においても、本顆粒は多数観察された(Fig. 4)。

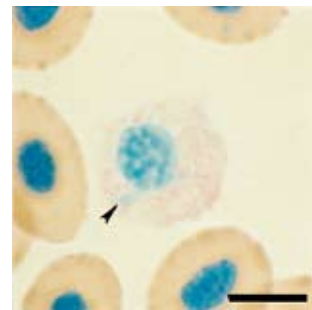


Fig. 1. A red sea-bream neutrophil stained with May-Grünwald concentrated-solution, which served as agents for both fixation and staining. After the staining for 5 min, the sample was washed with distilled water. Note many acidphilic granules (α -1 G). Bar= $5 \mu\text{m}$.

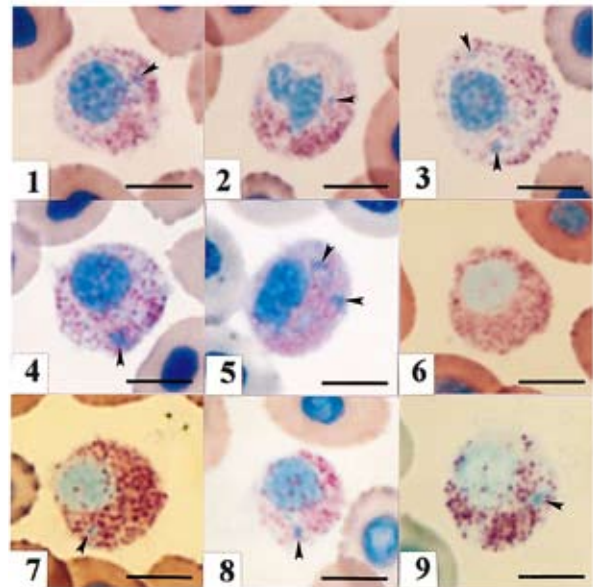


Fig. 2. Red sea-bream neutrophil stained with May-Grünwald solution under various conditions. After fixation and staining for 5 min with May-Grünwald concentrated-solution, the sample was stained again for 10 min in May-Grünwald diluted with the following solutions: (1) distilled water, (2) phosphate buffer (5 mM, pH5.0), (3) phosphate buffer (5 mM, pH6.0), (4) phosphate buffer (5 mM, pH7.0), (5) phosphate buffer (5 mM, pH8.0), (6) phosphate buffer ($1/15\text{M}$, pH5.0), (7) phosphate buffer ($1/15\text{M}$, pH6.0), (8) phosphate buffer ($1/15\text{M}$, pH7.0) and (9) phosphate buffer ($1/15\text{M}$, pH8.0). Arrowheads show Y-body. Bars= $5 \mu\text{m}$.

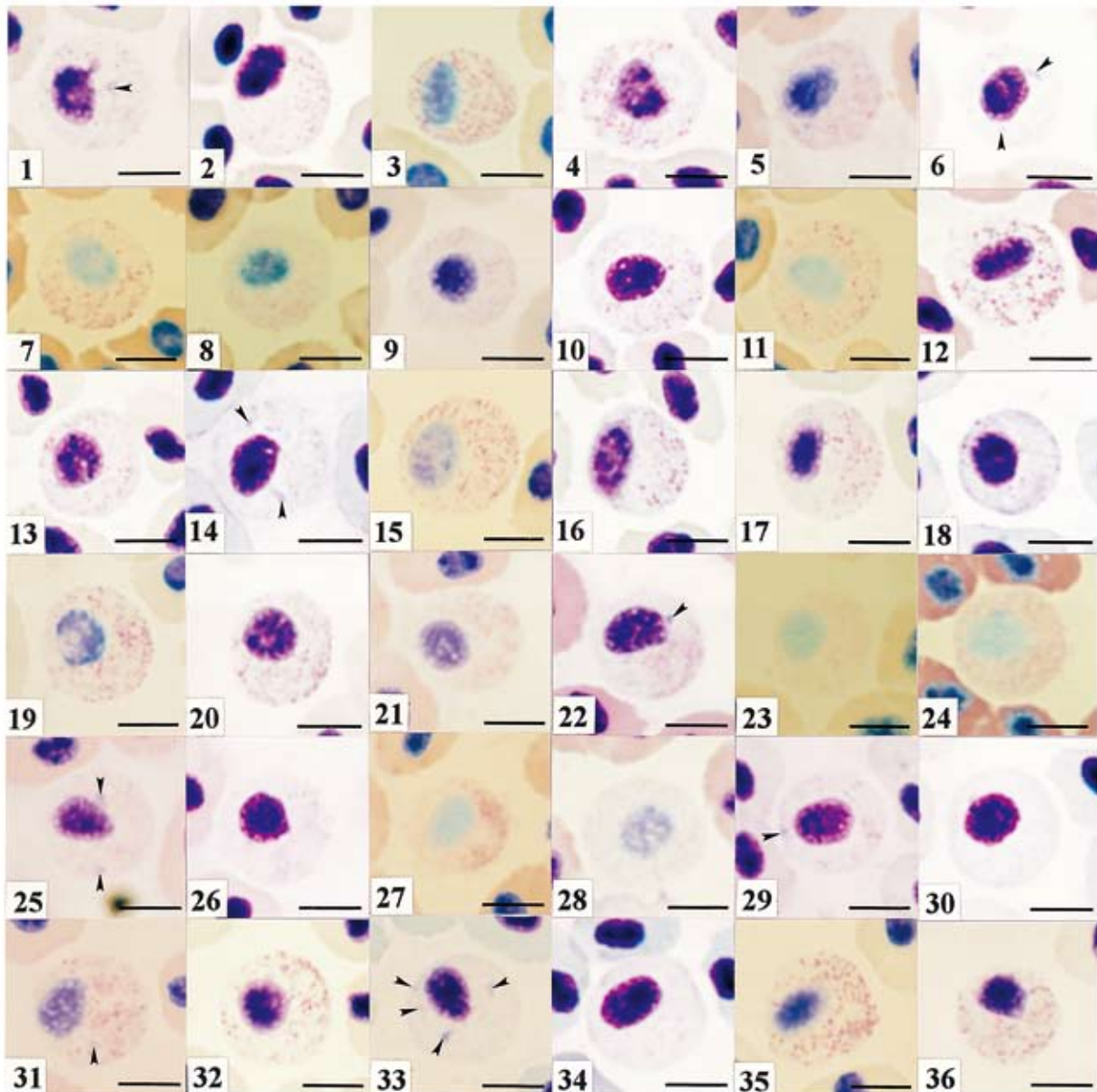


Fig. 3. Red sea-bream neutrophil under various staining conditions. Giemsa stain. After fixation for 5 min with methanol, the sample was stained with Giemsa solution diluted with the following solutions : (1) distilled water at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (2) distilled water at a rate of 1 : 20. 60 min. (3) distilled water at a rate of 1 : 100. 15 min. (4) distilled water at a rate of 1 : 100. 60 min. (5) 0.5 mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (6) 0.5 mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (7) 0.5 mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (8) 0.5 mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (9) 0.5 mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (10) 0.5 mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (11) 0.5 mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (12) 0.5 mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (13) 0.5 mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (14) 0.5 mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (15) 0.5 mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (16) 0.5 mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (17) 0.5 mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (18) 0.5 mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (19) 0.5 mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (20) 0.5 mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (21) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (22) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (23) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (24) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (25) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (26) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (27) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (28) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (29) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (30) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (31) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (32) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (33) $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (34) $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (35) $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (36) $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. Arrowheads show Y-body. Bars = 5 μ m.

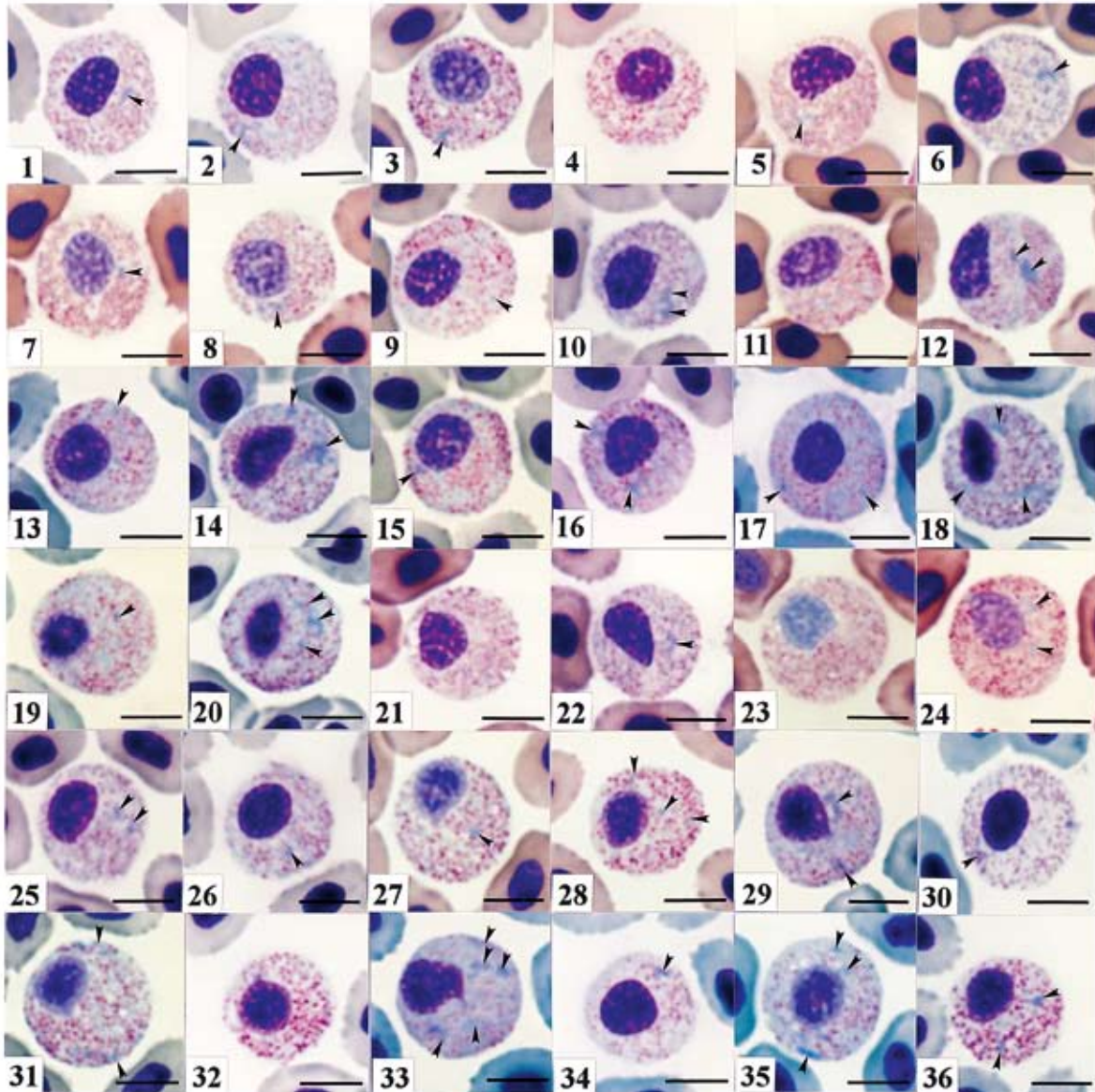


Fig. 4. Red sea-bream neutrophil under various staining conditions. May-Grünwald (MG) · Giemsa stain. After fixation and staining for 5 min with MG concentrated-solution, the sample was stained with MG diluted solution in various solutions for 10 min, followed by staining with Giemsa under the following conditions: (1) distilled water at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (2) distilled water at a rate of 1 : 20. 60 min. (3) distilled water at a rate of 1 : 100. 15 min. (4) distilled water at a rate of 1 : 100. 15 min. (5) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (6) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (7) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (8) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (9) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (10) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (11) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (12) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (13) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (14) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (15) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (16) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (17) 0.5mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (18) 0.5mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (19) 0.5mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (20) 0.5mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (21) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (22) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (23) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (24) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (25) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (26) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (27) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (28) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (29) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (30) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (31) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (32) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (33) $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (34) $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (35) $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (36) $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. Arrowheads show Y-body. Bars = 5 μ m.

β 顆粒は、円形または卵円形で長径 $0.5\mu\text{m}$ 以下であり、 α 顆粒よりも大きく細胞質に多数観察された。また、いずれの条件のRomanowsky型染色においても明瞭な色調を呈さず、難染色であった (Figs. 1~4)。

Y小体は、いずれの染色条件においても青色を呈し、形状は円形、楕円形、紐状など多様であった (Figs. 1~4)。

マダイ好中球の細胞化学的特性をTable 1に示した。酸性フォスファターゼ (AcP)、 β -グルクロニダーゼ (β -Glu)、 α -ナフチルアセテートエステラーゼ (α -NAE)、 α -ナフチルブチレートエステラーゼ (α -NBE) およびナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ (NASDCAE) 活性の存在を示す円形または卵円形の陽性顆粒が観察された (Figs. 5-1~5-5)。いずれの陽性顆粒も長径 $0.4\mu\text{m}$ 以下であったが、AcP、 α -NAEおよびNASDCAE陽性顆粒は、細胞質に多数観察されたのに対して (Figs. 5-1, 5-3, 5-5)、 β -Gluおよび α -NBE陽性顆粒は少数であった (Figs. 5-2, 5-4)。また、 β -Glu陽性顆粒を有さない好中球も存在した。ペルオキシダーゼ活性は、円形または卵円形の陽性顆粒 (長径 $0.5\mu\text{m}$ 以下) として認められ、細胞質に充満していた (Fig. 5-6)。アルカリ性フォスファターゼ (AIP) は検出されなかった。Periodic acid Schiff反応 (PAS) に陽性の顆粒が細胞質に多数観察された (Fig. 5-7)。PAS陽性顆粒は円形または卵円形で、直径 $0.3\mu\text{m}$ 以下であった。PAS陽性顆粒は、 α -アミラーゼ処理によって完全に消失した。

また、細胞質基質もPASに弱陽性であったが、これも α -アミラーゼ処理によって消失した。アルシアンブルー (AB) 染色では、陽性部位が観察されなかった。蒸留水に溶解したトルイジンブルー (TB) による染色では、種々の形態を示す青色の粗大な構造物が少数観察された

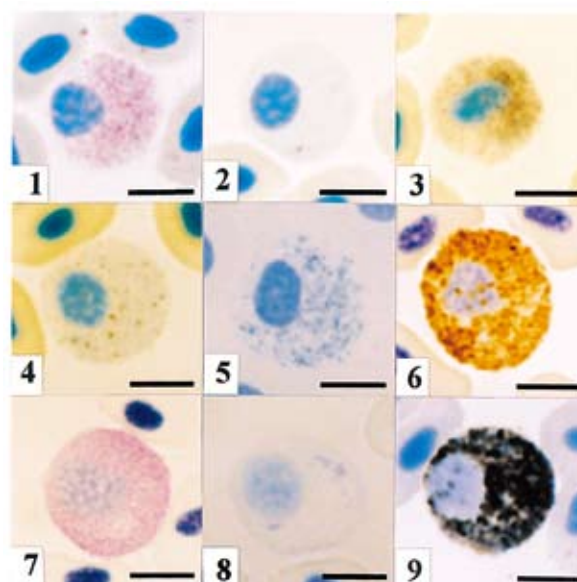


Fig. 5. Cytochemistry of red sea-bream neutrophil. (1) acid phosphatase, (2) β -glucuronidase, (3) α -naphtyl acetate esterase, (4) α -naphtyl butyrate esterase, (5)naphthol AS-D chloroacetate esterase, (6) peroxidase, (7)periodic acid Schiff reaction, (8) toluidine blue in distilled water, (9)sudan black B. Bars= $5\mu\text{m}$.

Table 1. Summary of reactions of red sea-bream neutrophil to cytochemical tests

Test	Positive site (shape, number and size)
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3\mu\text{m}$); Hyaloplasm
PAS after digestion with α -amylase	—
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Toluidine blue (distilled water)	Granule (amorphous, a few, equivalent to Y-body)
Sudan black B	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.5\mu\text{m}$, equivalent to β G)
SudanIII	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	—
Acid phosphatase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.4\mu\text{m}$, equivalent to α G)
β -Glucuronidase	Granule (round or oval, a few, $\phi \leq 0.4\mu\text{m}$)
α -Naphtyl acetate esterase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.4\mu\text{m}$, equivalent to α G)
α -Naphtyl butyrate esterase	Granule (round or oval, some, $\phi \leq 0.4\mu\text{m}$)
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.4\mu\text{m}$, equivalent to α G)
Peroxidase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.5\mu\text{m}$, equivalent to β G)

—, non detection.

(Fig. 5-8)。オイルレッドOおよびズダンⅢ染色では陽性部位が観察されなかったが、ズダンブラックB (SBB) 染色では、長径0.5 μm以下の円形または卵円形の陽性顆粒が細胞質に充満して観察された (Fig. 5-9)。

4 考 察

本研究の結果から、マダイの好中球には、2種類の顆粒 (α 顆粒, β 顆粒) とY小体が存在することが明らかとなった。

α 顆粒は、これまでに真骨魚類ではアジアアロワナ, ウナギ, コイ, ナイルティラピア, イサキ (以上 I 群魚類) およびトラフグ (II 群魚類) において報告されており^{1-5, 11, 12)}, いずれの魚種においても酸性条件下のMG染色で染まること, ギムザ染色では染色されないこと, およびMG染色で本顆粒を染色したのちにギムザ染色を施すと染色性が低下することが知られている^{1-5, 11, 12)}。また, α 顆粒の形状は, アジアアロワナでは桿形または紡錘形²⁾, コイおよびナイルティラピアでは円形^{3, 4, 11)}, イサキでは桿形¹²⁾, ウナギおよびトラフグでは円形, 卵円形または桿形である^{1, 5)}。本研究結果から, マダイ好中球に円形または卵円形の α 顆粒が観察された。しかし, その染色性は前述の真骨魚類とは異なっていた。マダイ好中球の α 顆粒は, いずれの希釈液を用いてもMG染色に染まり, ギムザ染色においても,

希釈液の種類によっては染色され, MGG染色を施しても, 染色性の低下がほとんど認められなかった。したがって, マダイの α 顆粒の内容物の種類またはその物理化学的特性は, 前述の真骨魚類とは異なると考えられる。

α 顆粒と類似した顆粒は, マダイの他の種類の血球には観察されなかったことから, 本顆粒はマダイ好中球の同定に有用な指標となると考えられる。

β 顆粒は, これまでに著者らが報告した全ての真骨魚類 (アジアアロワナ, ウナギ, コイ, ノーザンバイク, ナイルティラピア, イサキ, メジナ, オオクチバス, ブルーギル, スズキ, ヒラスズキ, タイリクスズキ, ヒラメ, トラフグ) で認められている¹⁻¹²⁾。いずれの魚種においても β 顆粒は円形から卵円形であり, 長径はアジアアロワナで0.5 μm以下²⁾, ウナギで0.6 μm以下¹⁾, コイで約0.5 μm^{3, 4)}, ノーザンバイクで0.5 μm以下⁶⁾, ナイルティラピア, イサキ, オオクチバス, ブルーギルおよびヒラメで0.5~1.0 μm^{8, 9, 11, 12)}, メジナで0.5~1.1 μm⁷⁾, スズキ, ヒラスズキ, タイリクスズキおよびトラフグで1.0 μm以下である^{5, 10)}。本研究において, マダイにも円形または卵円形の β 顆粒が観察され, その長径は0.5 μm以下であり, 他の真骨魚類と同様であった。

これまでに, コイを除く魚種において, 好塩基性を示す不定形のY小体が好中球に観察されている^{1, 2, 5-12)}。コイにおいても, 病原細菌 *Aeromonas hydrophila* に人為感染

Table 2. Comparison of cytochemical characteristics of fish neutrophil

Test ¹	Fish and type of cytoplasmic granule ^{2,3}									
	Sf (α G, β G, γ G)	Aj (α G, β G, γ G)	El (β G)	Lm (β G)	Lj (β G)	Li (β G)	Gp (β G)	Pm (α G, β G)	Po (β G)	Tr (α G, β G)
PAS	H: + G: +	H: + G: +	H: + G: +	H: + G: +	H: + G: +	H: + G: +	H: + G: +	H: + G: +	H: + G: +	H: + G: +
PAS- α A	H: - G: -	H: - G: -	H: - G: -	H: - G: -	H: - G: -	H: - G: -	H: - G: -	H: - G: -	H: - G: -	H: - G: -
AB (pH1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB (pH2.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TB	+, eq Yb	+, eq Yb	+, eq Yb	+, eq Yb	+, eq Yb	+, eq Yb	+, eq Yb	+, eq Yb	+, eq Yb	+, eq Yb
SBB	+	+	+	+	+	+	+	+, eq β G	+	+
SIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AIP	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AcP	-	+, eq γ G	+, eq β G	-	+	+	+	+, eq α G	+	+
β -Glu	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
α -NAE	+	+, eq γ G	+	-	+	+	+	+, eq α G	+	+
α -NBE	+	+, eq γ G	+	-	-	-	-	+	-	+
NASDCAE	+, eq γ G	+	+	-	+	+	-	+, eq α G	-	+
PO	+, eq β G	+, eq β G	+, eq β G	+, eq β G	+, eq β G	+, eq β G	+, eq β G	+, eq β G	+, eq β G	+, eq β G

¹PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS- α A, PAS after α -amylase digestion; AB, alcian blue; TB, toluidine blue; SBB, sudan black B; SIII, sudan III; ORO, oil red O; AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; β -Glu, β -glucuronidase; α -NAE, α -naphthyl acetate esterase; α -NBE, α -naphthyl butyrate esterase; NASDCAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PO, peroxidase.

²Sf, *Scleropages formosus* (Asian arowana, Kondo and Takahashi (2009)²⁾); Aj, *Anguilla japonica* (Japanese eel, Kondo and Takahashi (2009)¹⁾); El, *Exos lucius* (northern pike, Kondo et al. (2008)⁵⁾); Lm, *Lepomis macrochirus* (bluegill, Kondo et al. (2005)⁹⁾); Lj, *Lateolabrax japonicus* (Japanese seabass, Kondo et al. (2007)¹⁰⁾); Li, *Lateolabrax latius* (seabass, Kondo et al. (2007)¹⁰⁾); Gp, *Girella punctata* (rudderfish, Kondo et al. (2005)³⁾); Pm, *Pagrus major* (red sea-bream, present report); Po, *Paralichthys olivaceus* (Japanese flounder, Kondo et al. (2005)⁸⁾); Tr, *Takifugu rubripes* (tiger puffer, Kondo et al. (2007)⁵⁾); α G, eosinophilic (acidophilic) granule; β G, chromophobic granule; γ G, basophilic granule.

³H, hyaloplasm; G, granular; -, negative; +, positive; eq, equivalent to; Yb, Yasumoto body.

させることで、本小体を有する好中球が血液中出现することが報告されている¹⁵⁾。マダイの好中球にもY小体が観察されたことから、本小体は真骨魚類に共通する形質と考えられる。

マダイの好中球には、円形または卵円形のPAS陽性顆粒が細胞質に多数観察された。しかし、PAS陽性顆粒は α 顆粒および β 顆粒よりも小型であり、 β 顆粒のように細胞質に充満することはない。さらに、PAS陽性顆粒は α -アミラーゼによって完全に消化されることから、PAS陽性顆粒はグリコーゲンを主成分とする構造物であり、 α および β 顆粒とは異なると考えられる。AcP、 α -NAEおよびNASDCAE陽性顆粒は、細胞質に多数観察され、長径0.4 μ m以下の円形または卵円形であることから、これらの酵素活性は α 顆粒に存在すると考えられる。一方、 β -Glcおよび α -NAE陽性顆粒は少ないことから、本酵素の存在部位は特定できない。ペルオキシダーゼ陽性顆粒とSBB陽性顆粒は、円形または卵円形であり、長径が0.5 μ m以下であること、また、細胞質に充満することから、 β 顆粒に相当すると考えられる。これまでに、真骨魚類の好中球には各種酵素が検出されているが (Table 2)、存在部位が推定されているものは少なく、アジアアロワナ好中球では γ 顆粒がNASDCAE陽性であり²⁾、ウナギの γ 顆粒にはAcP、 α -NAEおよび α -NBEが存在すると考えられている¹⁾。また、ノーザンパイク好中球のAcP活性は β 顆粒に局在すると考えられている⁶⁾。一方、ペルオキシダーゼはアジアアロワナ、ウナギ、ノーザンパイク、ブルーギル、メジナ、スズキ、ヒラスズキ、ヒラメおよびトラフグにおいて観察されており^{1, 2, 5, 6, 8-10)}、顆粒数、大きさおよび形状が類似していることから、本酵素は β 顆粒に局在すると考えられている^{1, 2, 5, 6, 8-10)}。TB陽性部位はアジアアロワナ、ウナギ、ノーザンパイク、ブルーギル、メジナ、スズキ、ヒラスズキ、ヒラメおよびトラフグにおいて観察されており^{1, 2, 5, 6, 8-10)}、形態学的特徴から、Y小体に相当すると考えられている^{1, 2, 5, 6, 8-10)}。また、コイにおいても*A. hydrophila*感染によって出現した好中球のY小体は、TBに陽性であることが報告されている¹⁵⁾。TB染色によってマダイ好中球に種々の形態を示す青色の粗大な陽性部位が観察され、その形態学的特徴から、マダイにおいてもTB陽性部位はY小体に相当すると思われる。

マダイの好中球に α 顆粒と β 顆粒が存在することは、本魚種がII群に含まれることを示唆している。しかし、 α 顆粒の染色性が、これまでに報告されているII群のトラフグ

とは異なることから、トラフグとマダイをそれぞれII-A群とII-B群に細分することを提案する。フグ目は、スズキ目から派生したと考えられている¹⁴⁾。しかし、トラフグの α 顆粒の染色性はマダイとは異なり、I群の α 顆粒と類似する。したがって、トラフグを含むフグ目が、マダイが属するタイ科から派生したとは考え難い。フグ目を派生したスズキ目魚類はII-A群に属し、これからタイ科魚類の祖先種が分岐し、 α 顆粒の特性が独自の進化を遂げて、II-B群を形成するに至ったのではないかと予想される。

マダイの血液中には、好中球と好酸球の2種類の顆粒球が知られているが¹⁶⁾、その好中球と同様の血球は、本研究では全く観察されなかった。また、その好酸球は細胞質に好酸性顆粒を有することから名づけられた血球であり、本研究における好中球と同一の血球と考えられる。マダイ好中球の α 顆粒は染色性がI群およびII群のトラフグとは異なり、染色条件によってはギムザ染色でも染まる。また、いずれの条件においてもMGG染色標本に観察されることから、本顆粒を有する顆粒球の存在はこれまでも知られていたと考えられる。しかし、マダイの好中球には、ペルオキシダーゼ陽性の β 顆粒と好酸性顆粒 (α 顆粒)が存在し、前者はこれまで報告した全ての真骨魚類の好中球に存在し、後者はI群およびII群の魚種においても観察されることから、本血球を好中球と命名することに問題はないと考える。

文 献

- 1) 近藤昌和, 高橋幸則: ウナギ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大研報, 58, 1-13 (2009)
- 2) 近藤昌和, 高橋幸則: アジアアロワナの好中球顆粒. 水大研報, 57, 219-226 (2009)
- 3) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: コイ好中球のメイグリュンワルド・ギムザ染色性. 水大研報, 50, 109-117 (2002)
- 4) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: コイ好中球のアズール顆粒. 水大研報, 51, 17-29 (2002)
- 5) 近藤昌和, 稲川裕之, 池田 至, 山元憲一, 高橋幸則: トラフグ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大研報, 55, 133-139 (2007)
- 6) 近藤昌和, 高橋幸則, 山元憲一: ノーザンパイク好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大研報, 56, 317-321 (2008)

- 7) 近藤昌和, 金丸俊介, 高橋幸則: メジナの好中球顆粒. 水大研報, 52, 67-71 (2004)
- 8) 近藤昌和, 金丸俊介, 柏村直宏, 稲川裕之, 高橋幸則: ヒラメおよびメジナ好中球顆粒の細胞化学的特徴. 水大研報, 53, 203-209 (2005)
- 9) 近藤昌和, 柏村直宏, 金丸俊介, 稲川裕之, 高橋幸則: サンフィッシュ科魚類 (オオクチバス, ブルーギル) の好中球顆粒. 水大研報, 53, 197-202 (2005)
- 10) 近藤昌和, 稲川裕之, 高橋幸則: スズキ科魚類 (スズキ, ヒラスズキ, タイリクスズキ) の好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大研報, 55, 141-147 (2007)
- 11) 安本信哉, 近藤昌和, 高橋幸則: テラピア好中球顆粒のメイ-グリェンワルド・ギムザ染色性. 水大研報, 51, 79-86 (2003)
- 12) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: イサキ好中球の顆粒. 水大研報, 52, 45-48 (2004)
- 13) 矢部 衛: 魚類の多様性と系統分類, 松井正文編 脊椎動物の多様性と系統. 裳華房, 東京, 46-93 (2006)
- 14) Gill A C and Mooi R D: Phylogeny and Systematics of Fishes. In: Hart P J B and Reynolds J D (eds) Handbook of Fish Biology and Fisheries Vol. 1. Blackwell Publishing, Oxford, 15-42 (2002)
- 15) 近藤昌和, 高橋幸則: 病原細菌 *Aeromonas hydrophila* に感染したコイの好中球の安本小体. 水大研報, 56, 323-327 (2008)
- 16) 池田彌生, 尾崎久雄, 瀬崎啓次郎: 21 マダイ, 魚類血液学図鑑. 緑書房, 東京, 72-73 (1986)